



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 051 054** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **A 61 K 39/395**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5045574/14, 14.04.1992

(46) Дата публикации: 27.12.1995

(56) Ссылки: Патент США N 4617379, кл. А 61К 39/00, 1986.

(71) Заявитель:
Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
им.Г.Н.Габричевского

(72) Изобретатель: Кострова О.М.,
Алешкин В.А.

(73) Патентообладатель:
Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
им.Г.Н.Габричевского

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии, и может быть использовано для иммунотерапии и иммунопрофилактики инфекций, вызываемых вирусом простого герпеса. Целью настоящего изобретения является удешевление способа производства препарата противогерпетического иммуноглобулина человека и утилизация отходов промышленного фракционирования плазмы крови человека. Поставленная цель достигается тем, что в качестве исходного сырья для производства препарата противогерпетического иммуноглобулина человека используется осадок Б, образующийся при спиртовом фракционировании плазмы крови нативных невакцинированных доноров, имеющей исходно высокое содержание антител к

вирусу простого герпеса. Способ предусматривает обработку водного экстракта осадка Б хлороформом и декстрансульфатом, после чего проводится последовательное фракционирование полиэтиленгликолем с молекулярной массой 4000 из расчета 2 -4% и 5 -7% по объему. Для осаждения фракции JgG добавляют полиэтиленгликоль до насыщения 12 14% по объему. Способ позволяет удешевить производство препарата противогерпетического иммуноглобулина человека и использовать отходы промышленного фракционирования человеческой плазмы, так как он позволяет получить из балластной фракции (осадок Б) препарат противогерпетического иммуноглобулина человека, состоящий на 97% из JgG. 1 табл.

RU 2 051 054 C1

RU 2 051 054 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 051 054** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl. ⁶ **A 61 K 39/395**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5045574/14, 14.04.1992

(46) Date of publication: 27.12.1995

(71) Applicant:
Moskovskij nauchno-issledovatel'skij
institut ehpidemiologii i mikrobiologii
im.G.N.Gabrichевского

(72) Inventor: Kostrova O.M.,
Aleshkin V.A.

(73) Proprietor:
Moskovskij nauchno-issledovatel'skij
institut ehpidemiologii i mikrobiologii
im.G.N.Gabrichевского

(54) **METHOD OF PREPARING PREPARATION OF HUMAN ANTIHERPETIC IMMUNOGLOBULIN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: the parental source for human antiherpetic preparation producing is precipitate B formed at alcohol separation of plasma blood from native nonvaccinated donors containing initially high antibody content to the simplex herpes virus. Method involves the treatment of aqueous extract of precipitate B with chloroform and dextran sulfate followed by

sequence separation with polyethylene glycol (molecular mass is 4000) taken at concentrations 2-4% and 5-7% by volume. For precipitation fraction IgG polyethylene glycol is added up to saturation 12-14% by volume. The content of IgG in human antiherpetic immunoglobulin preparation obtained from ballast fraction (precipitate B) is 97% EFFECT: decreased cost, usage of waste. 1 tbl

RU 2 051 054 C1

RU 2 051 054 C1

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии, и может быть использовано для иммунотерапии и иммунопрофилактики инфекций, вызываемых вирусом простого герпеса (ВПГ).

Актуальность изобретения обуславливается резким увеличением в настоящее время числа заболеваний, вызываемых ВПГ, что связано в значительной степени с ухудшающейся экологической обстановкой, а также с все более широким применением иммуносупрессивной терапии.

Одним из перспективных подходов при профилактике и лечении герпесвирусных инфекций является применение препаратов иммуноглобулинов человека.

К настоящему моменту установлено, что вирусспецифические антитела играют существенную роль в патогенезе герпетических инфекций. Защитное действие герпесспецифических антител связывают как с их непосредственным участием в нейтрализации вирусных частиц, так и с активацией или комплемент-опосредованного лизиса и антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности в отношении инфицированных ВПГ-клеток.

В настоящее время выпуск препарата противогерпетического иммуноглобулина человека, как в отечественной медицинской промышленности, так и за рубежом не налажен.

Известен способ получения препарата цитомегаловирусного иммуноглобулина (U.S. Pat. No. 4.617, 379). Он предусматривает отбор плазмы нативных невакцинированных доноров с высокими титрами антител к цитомегаловирусу и ее последующее фракционирование по методу Cohn и Oncley с целью получения фракции II, представляющей собой гипериммунный цитомегаловирусный иммуноглобулин.

Однако данный способ получения препарата иммуноглобулина предусматривает использование дорогостоящего сырья плазмы крови доноров. Кроме того, образующийся при фракционировании плазмы осадок Б (фракция III Кона), является балластной фракцией и не утилизируется.

Целью настоящего изобретения является удешевление способа производства препарата противогерпетического иммуноглобулина человека и утилизация отходов промышленного фракционирования плазмы крови человека.

Поставленная цель достигается тем, что в качестве исходного сырья для производства препарата противогерпетического иммуноглобулина человека используется осадок Б (фракция III Кона), образующийся при спиртовом фракционировании плазмы крови нативных невакцинированных доноров, имеющей исходно высокое содержание антител к ВПГ.

Проведенные нами исследования показали, что осадок Б содержит герпесспецифические антитела, причем их титры имеют практически те же значения, что и в плазме крови, что позволяет рассматривать осадок Б как доступное дешевое сырье для получения препарата противогерпетического иммуноглобулина человека. Преимущество использования данного источника сырья заключается также в

том, что осадок Б обогащен 3 и 4 подклассами IgG. Это особенно важно, так как известно, что при рецидивирующей герпетической инфекции герпесспецифические антитела представлены в основном 1, 3 и 4 подклассами IgG.

Способ предусматривает обработку водного экстракта осадка Б хлороформом и декстрансульфатом, после чего проводится последовательное фракционирование раствором полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000 из расчета 2-4% по объему и 5-7% по объему. Для осаждения фракции IgG добавляют полиэтиленгликоль до насыщения 12-14% по объему.

Способ поясняют следующим примером.

Приготовление экстракта из осадка Б.
1 кг осадка Б суспендируют в 30 л охлажденной апиогенной дистиллированной воды при постоянном перемешивании. pH смеси устанавливают 5,2-0,5. После отстаивания в течение 18 ч при $t + 5^{\circ}\text{C}$ смесь центрифугируют в течение 1 ч при 3000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Осадок удаляют, в полученном экстракте определяют содержание белка, которое равно 1% Объем полученного экстракта составляет 15900 мл.

Удаление балластных фракций путем обработки экстракта осадка Б хлороформом и декстрансульфатом.

К экстракту осадка Б добавляют 160 мл охлажденного до $+5^{\circ}\text{C}$ хлороформа (1% по объему). Смесь медленно перемешивают в течение 2 ч при температуре $+5^{\circ}\text{C}$. К смеси экстракта с хлороформом добавляют 328 мл 5%-ного раствора декстрансульфата (конечная концентрация 0,1%). Смесь энергично встряхивают в течение 5-10 мин и центрифугируют при 3000 об/мин на центрифуге с охлаждением до получения прозрачного центрифугата. Осадок удаляют. Объем центрифугата составляет 12 л, содержание белка 0,2%.

Осаждение IgG полиэтиленгликолем (ПЭГ).

К 12 л экстракта добавляют ПЭГ (МВ.4000) из расчета 2 г на 100 мл раствора при постоянном перемешивании. Через 2 ч осадок отделяют фильтрацией через миллипоровые фильтры $\mu = 0,45$, а к супернатанту добавляют ПЭГ из расчета 6% по объему. Смесь медленно перемешивают в течение 2 ч. Образовавшийся осадок удаляют путем фильтрации через миллипоровые фильтры $\mu = 0,45$. pH супернатанта доводят до 8,0 6% тригидроксизетиламинометаном.

Для осаждения IgG к супернатанту добавляют 50%-ный раствор полиэтиленгликоля до конечной концентрации 13% при постоянном перемешивании.

Осадок IgG отделяют путем декантации и центрифугирования в течение 15-30 мин при 3000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Осадок промывают 300-400 мл апиогенной дистиллированной воды, подкисленной до pH $5 \pm 0,2$ при температуре от 0 до $+2^{\circ}\text{C}$.

Растворение осадка IgG.

Осадок IgG растворяют в охлажденном 0,9%-ном растворе хлорида натрия до содержания белка 10% pH 6,3. После растворения осадка препарат центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин на центрифуге с охлаждением для удаления нерастворимых примесей.

К раствору после центрифугирования

добавляют глюкозу до конечной концентрации 2% в качестве стабилизатора. После стерилизующей фильтрации через миллипоровые фильтры $\mu = 0,2$ препарат разливают по ампулам и лиофилизируют. Хранят в сухом темном месте при температуре $(6 \pm 4)^\circ\text{C}$. Срок хранения 3 года.

После растворения осадка IgG в готовом препарате определяют количественное содержание подклассов IgG и специфическую активность.

Распределение подклассов IgG определенное методом радиальной иммунодиффузии с использованием стандартов фирмы Nordic Immunological Laboratories", представлено в таблице.

Титр антител в препарате, определенный методом твердофазного иммуноферментного анализа, составляет 1: 256000, что позволяет использовать данный препарат в профилактических и лечебных целях при инфекциях, вызываемых ВПГ.

Количество иммунологически неактивных примесей составляет не более 2-3% что регламентировано НТД на иммуноглобулин.

Предлагаемый способ имеет преимущество, так как позволяет получить из балластной фракции III (осадок Б) препарат противогерпетического иммуноглобулина человека, состоящий на 97% из IgG.

Технико-экономическая эффективность.

Предлагаемый способ позволяет удешевить производство препарата противогерпетического иммуноглобулина человека и использовать отходы промышленного фракционирования плазмы крови человека, так как он предполагает использование в качестве исходного сырья при производстве препарата осадка Б, являющегося балластной фракцией, образующейся при спиртовом фракционировании плазмы крови.

Формула изобретения:

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА путем спиртовой обработки плазмы невакцинированных доноров с высоким содержанием антител к вирусу простого герпеса последовательно 8-, 25- и 17%-ным раствором этилового спирта с последующим центрифугированием и отделением целевого продукта, отличающийся тем, что после обработки раствором 17%-ного этилового спирта собирают осадок, разводят водой, инкубируют при перемешивании, центрифугируют, обрабатывают хлороформом и декстрансульфатом, снова центрифугируют и проводят поэтапное осаждение целевого продукта полиэтиленгликолем из расчета 2 4, 5 7, 12 14 об.

Распределение подклассов IgG в исходном сырье и в препарате противогерпетического иммуноглобулина

	Подклассы IgG (%)			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Плазма	60,6	27,8	7,1	4,5
Осадок Б	61,8	17,1	9,1	12,0
Препарат противогерпетического иммуноглобулина	61,0	15,9	10,4	12,7

RU 2051054 C1

RU 2051054 C1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<p>53/40 A96 B04 MOEP= 92.04.14 EPIDEMIOLOGY & MICROBIOL INST *RU 2051054-C1 .14 92SU-5045574 (95.12.27) A61K 39/395 of human anti-herpetic immunoglobulin - comprises Cohn III fraction from non-vaccinated donor blood with chloroform and dextran sulphate and fractionating ethylene glycol (Rus) 25875 data: KOSTROVA O M, ALESHKIN V A</p>	<p>A(5-H3, 12-V3B, 12-W11L) B(4-B4D2) .1</p>
<p>anti-herpetic immunoglobulin prepn. can be obtd. more easily by using wastes from commercial blood plasma fractionation as the raw material. The latter comprises Cohn fraction B) formed from the cold ethanol fractionation of blood from unvaccinated donors with a high concn. of HSV antigens. When an aq. extract of ppt. B has been treated with acid dextran sulphate, it is fractionated successively with ethylene glycol (4000 mol.wt.) in 2-4, 5-7 then 12-14 vol. % <u>TAGE</u> technique is more economical and yields a prepn. which contains 97% IgG.</p>	<p><u>EXAMPLE</u> A mixt. of ppt. B aq. extract (15.9 l), CHCl₃ (160 ml) and dextran sulphate soln. (328 ml) was stirred, then centrifuged. After successive fractionation with PEG in increasing concns., the residual IgG ppt. was dissolved in 0.9% NaCl soln., then glucose was added as a stabiliser. The immunoglobulin could be stored for 3 years, had immunologically inactive impurity concn. 2-3% and IgG subclass content (%): 61.0 (1), 15.9 (2), 10.4 (3) and 12.7 (4). (LV) (4pp031DwgNo.0/0)</p>

RU 2051054-

BEST AVAILABLE COPY

© 1996 Derwent Information Limited
 Derwent House 14 Great Queen Street London WC2B 5DF England UK
 Derwent Incorporated
 1420 Spring Hill Road Suite 525 McLean VA 22102 USA

THIS PAGE BLANK (USPTO)